

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

Ref. NPL2
No. 09/830,968

(11)Publication number : 05-252942

(43)Date of publication of application : 05.10.1993

(51)Int.Cl. C12N 5/06
C12N 5/10
C12P 21/00
 //(C12P 21/00
C12R 1:91)

(21)Application number : 04-117275

(71)Applicant : BOEHRINGER MANNHEIM GMBH

(22)Date of filing : 11.05.1992

(72)Inventor : KOCH STEFAN DR
BEHRENDT ULRICH DR
FRANZE REINHARD DR
LORENZ THOMAS DR
SZPERALSKI BERTHOLD DR

(30)Priority

Priority number : 91 4115722 Priority date : 14.05.1991 Priority country : DE

(54) SERUM-FREE MEDIUM FOR CULTURING MAMMALIAN CELL WITHOUT PROTEINIC MATERIAL OF ANIMAL ORIGIN AND CULTURE OF MAMMALIAN CELL

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a serum-free culture medium manifesting no hazard of viral contamination even under conditions highly close to those in the case when using serum-contg. media, and intended for culturing cells of entirely common mammals without any proteinic material of animal origin.

CONSTITUTION: This serum-free medium contains, other than ordinary contents, a recombinant insulin derived from prokaryotes and a water-soluble iron compound instead of animal insulin and transferrin.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 11.05.1992

[Date of sending the examiner's decision of rejection] 28.03.1995

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

*** NOTICES ***

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] The culture medium of blood serum non-** for cultivating a mammals cell without the protein ingredient of the animal origin containing the recombination insulin and the water-soluble iron compound from a procaryote instead of [other than the contents matter in ordinary use] an animal insulin and transferrin.

[Claim 2] The culture medium according to claim 1 which contains an insulin in the amount of 0.1 - 20 mg/l, and contains a water-soluble iron compound by the concentration of 10^{-5} - 10^{-2} mol/l.

[Claim 3] The culture medium according to claim 1 or 2 which contains ferric citrate, an iron sulfate, ferric chloride, and/or a potassium hexacyanoferrate as a water-soluble iron compound.

[Claim 4] A culture medium given [to claims 1-3 which contain a pH indicator additionally] in any 1 term.

[Claim 5] The amino acid of the concentration of 3 - 700 mg/l melted by water, the vitamin of 0.001 - 50 mg/l, The monosaccharide of 0.3 - 10 g/l, the inorganic acid of 0.1 - 10000 mg/l, The trace element of 0.001-0.1, the nucleoside of 0.1 - 50 mg/l, The fatty acid of 0.001 - 10 mg/l, the biotin of 0.01 - 1 mg/l, The hydrocortisone of 0.1-20microg/l, the insulin of 0.1 - 20 mg/l, The vitamin B12 of 0.1 - 10 mg/l, the putrescine of 0.01 - 1 mg/l, the pyruvic-acid sodium of 10 - 500 mg/l, a water-soluble iron compound, and the culture medium given [to claims 1-4] in any 1 term it is unstated from a pH indicator and an antibiotic with a case.

[Claim 6] A culture medium given [to claims 1-5 which contain polyvinyl alcohol and/or methyl cellulose additionally] in any 1 term.

[Claim 7] A culture medium given [to claims 1-6 which are suitable for culture of a CHO cell] in any 1 term.

[Claim 8] The culture medium according to claim 7 whose foreign gene which should be expressed is a gene to erythropoietin.

[Claim 9] How to cultivate the mammals cell characterized by cultivating in a culture medium given [to claims 1-8] in any 1 term.

[Claim 10] The culture medium made to run short is used. Advantageously twice between culture 48 hours and 96 hours after Respectively The recombination insulin 0.1 - 1 g/l, a glucose 40 - 200 g/l, and an aspartic acid, Asparagine xH₂O, a histidine, a methionine, a proline, each serine 0.4 - 3 g/l, The approach according to claim 9 by which cysteine xHClxH₂O 1 - 5 g/l, a glutamine 1 - 8 g/l, and a tryptophan 0.2 - 2 g/l are added, and the concentration to which a culture medium given [to claims 1-8] in any 1 term ****s is attained by that cause.

[Claim 11] The method according to claim 9 or 10 of cultivating the CHO cell which secretes erythropoietin.

[Claim 12] The gene engineering-manufacture approach of the erythropoietin characterized by cultivating the CHO cell containing the gene to erythropoietin by the approach given [to the inside of a culture medium given / to claims 1-8 / in any 1 term, or claims 9-11] in any 1 term, and isolating erythropoietin from this culture medium.

[Translation done.]

* NOTICES *

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Application] This invention relates to the gene engineering-manufacture approach of the erythropoietin which grows the CHO cell which ****ed and carried out the transformation to the approach and the last which cultivate a mammals cell, especially a CHO cell using the culture medium of blood serum non-** for cultivating a mammals cell without the protein ingredient of the animal origin, and this kind of culture medium in the culture medium by this invention.

[0002]

[Description of the Prior Art] a growth of the animal cell in the inside of a culture medium sake -- as a culture-medium additive -- general -- a blood serum -- fetal calf serum is a prerequisite mostly. In this case, the additive of the blood serum of a constant rate is mixed to the basal medium containing a fixed fundamental component, for example, mineral salt, amino acid, monosaccharide, a vitamin, etc., and this provides a cell with the most advantageous conditions for growth in a cell culture at it.

[0003] In the culture medium of well-known blood serum non-**, to change a blood serum into the quality of a substitute is already tried. For example, from the Federal Republic of Germany patent application public presentation No. 3733453 specification, the culture medium of blood serum non-** for culture of syncytium and a myeloma cell is well-known, and this contains the water-soluble iron compound in a synthetic culture culture medium instead of other well-known additives. substitution matter **** to the transferrin by which this water-soluble iron compound is contained in the column of the detailed description of this specification in a blood serum -- things are indicated. For culture of syncytium and a myeloma cell, the culture medium mentioned here by this patent application public presentation specification is usable.

[0004] However, in the blood serum, other matter which can affect growth of a mammals cell contains. The insulin and albumin other than transferrin are mentioned especially here. Therefore, generally, when using the culture medium of blood serum non-** for culture of a mammals cell, it should completely warn to approach the conditions which added the blood serum as much as possible. However, the quality of a substitute is important because of manufacture of a remedy. In this case, it is because a pathogenic virus also reaches a cell culture medium and this appearance at an end product through it which the license government office is careful of in a cell culture product, especially concerning the protein as an animal or a culture-medium additive of the Homo sapiens origin, that is, this component.

[0005]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] Therefore, although the technical problem of this invention was remarkably close to the culture condition which used the culture medium which has a blood serum, it was offering the culture culture medium of blood serum non-** for the mammals of the completely general class which does not contain the protein of the animal origin as risk of virus contamination not shown.

[0006]

[Means for Solving the Problem] The aforementioned technical problem is solved instead of [other than the usual contents] an animal insulin and transferrin by the culture medium containing the recombination insulin and the water-soluble iron compound from a procaryote of blood serum non-** for culture of a mammals cell without the protein ingredient of the animal origin.

[0007] By maintaining an insulin in the culture medium by this invention, a culture condition is clearly similar in the culture condition which used the blood serum from the case of the well-known culture culture medium of blood serum non-**. In addition, the risk of virus contamination is avoided by using the recombination insulin from a procaryote for the culture medium by this invention.

[0008] the usual usual contents matter of a culture culture medium -- this contractor -- well-known

-- for example, -- Medien Dulbecco's modified Eagle Medium (Virology 8 (1959) 396) or -- It is indicated by Medium F12 (Ham's F12 Medium, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 53 (1965) 228). Especially this is amino acid, a vitamin and other components, for example, a glucose, pyruvic-acid sodium, a specific fatty acid, and mineral salt.

[0009] In the advantageous embodiment of this invention, a culture medium contains the insulin of the amount of 0.1 - 20 mg/l, and the water-soluble iron compound of the concentration of 10-5 - 10-2 mol/l. As a water-soluble iron compound, iron acetate (III), iron(III) sulfate, an iron(III) chloride, and/or a potassium hexacyanoferrate (III) are used especially.

[0010] Because of the simplification in culture, it is usually advantageous to a culture medium to add a pH indicator additionally. This kind of compound is well-known to this contractor. For example, Phenol Red is mentioned here.

[0011] Especially the advantageous culture medium of blood serum non-** by this invention The amino acid of the concentration of 3 - 700 mg/l, The vitamin of 0.001 - 50 mg/l, the monosaccharide of 0.3 - 10 g/l, The mineral salt of 0.1 - 10000 mg/l, the trace element of 0.001 - 0.1 mg/l, The nucleoside of 0.1 - 50 mg/l, the fatty acid of 0.001 - 10 mg/l, The biotin of 0.01 - 1 mg/l, the hydrocortisone of 0.1-20microg/l, The insulin of 0.1 - 20 mg/l, the vitamin B12 of 0.1 - 10 mg/l, the putrescine of 0.01 - 1 mg/l, A pH indicator and an antibiotic are contained by the pyruvic-acid sodium of 10 - 500 mg/l, the water-soluble iron compound, and the case, and the aforementioned compound melts and exists in water in that case. In this case, the concentration display is related with the only component, respectively, and is not related with total of the aforementioned compound. For example, by this invention, the mixture of a DMEM- and F12-culture medium can be used. It is considering as the basal medium and can be used, and it ****s, and it can rearrange and the culture medium of marketing of further others of a presentation which was described above can also be replaced with the special component of an insulin and a water-soluble iron compound.

[0012] Within the limits of this invention, it is still more advantageous that a culture medium especially contains polyvinyl alcohol and/or methyl cellulose additionally. Use of polyvinyl alcohol is B.D.Bavister in The Journal of Experimental Zoology 217 (1981) and 45-51 to for example, the Europe patent No. 0248656 specification and this appearance. It reaches. Shintani et al.in Appl.Microbiol.Biotechnol.27 (1988) and 533-537 It is indicated. Furthermore, addition of polyvinyl alcohol and/or methyl cellulose is advantageous for the culture medium by this invention. In this case, as for these compounds, it is advantageous to use it by the concentration of 0.1 - 20 g/l.

[0013] Especially the culture medium by this invention is characterized by being suitable for culture of a CHO cell. On the occasion of culture of the CHO cell which contains and expresses a foreign gene, the good fitness of the culture medium by this invention was shown especially. The foreign gene which should be expressed in a CHO cell within the limits of this invention is a gene to erythropoietin advantageously.

[0014] Therefore, another object of this invention is the approach of cultivating a mammals cell, especially a CHO cell in the culture medium by this invention. In this case, the culture culture medium by this invention made to lack the specific matter is used. Between culture, 48 hours and 96 hours after advantageously twice, respectively Subsequently, the recombination insulin 0.1 - 1 g/l, Glucose 40 - 200 g/l and aspartic-acid, and asparagine xH2O, A histidine, a methionine, a proline, each serine 0.4 - 3 g/l, each mixture which consists of cysteine xHClxH 2O1 the 5 g/l glutamine 1 - 8 g/l, and tryptophan 2 g/l -- 2 capacity % was added and the approach this attained the concentration to which the culture medium by this invention ****s turned out to be advantageous especially. In advantageous approach actuation, growth could be held in comparatively high proportion over long space-time, and it was shown that cell mass higher than the case where this compound that used the culture culture medium immediately and that case [a compound] and ****s is consumed from the beginning is obtained.

[0015] Furthermore, the approach by this invention is suitable for culture of a CHO cell, especially the CHO cell which secretes erythropoietin.

[0016] Therefore, another object of this invention is among the culture medium according the CHO cell containing the gene to erythropoietin to this invention, or is the gene engineering-manufacture approach of the erythropoietin which cultivates by the approach by this invention and isolates erythropoietin from a culture culture medium.

[0017]

[Example] Next, this invention is explained in full detail per example using a drawing.

[0018] The culture medium of the example in which the culture medium used in the example carried out the written following contains pyruvic-acid Na (10 - 500 mg/l) and a pH indicator in the amino acid of the concentration of 3 - 700 mg/l, the vitamin of 0.001 - 50 mg/l, the monosaccharide of 0.3

“ - 10 g/l, the mineral salt of 0.1 - 10000 mg/l, the trace element of 0.001 - 0.1 mg/l, the nucleoside of 0.1 - 50 mg/l, the fatty acid of 0.01 - 10 mg/l, and a pan. This culture medium was manufactured considering the culture medium DMEM which consists of the same capacity rate, and F12 (Dulbeccos Modified Eagles Medium and Nutrient Mixture Hams F -12) as the base. the following are contained as a special component — :biotin 0.2036 mg/l hydrocortisone 3.6 mug/l insulin (recombination) 5.0 mg/l putrescine 0.1 mg/l vitamin B12 0.78 What is contained in addition to this in the culture medium of the example 1 of mg/l: Transferrin (Homo sapiens) 5 mg/l sodium selenite 5 mug/l polyvinyl alcohol 1 What is contained in addition to this in the culture medium of the example 2 of g/l: Iron acetate 124 mg/l polyvinyl alcohol What is contained in addition to this in the culture medium of the example 3 of 1 g/l: Iron acetate 124 mg/l methyl cellulose 0.5 In three examples of all g/l, the CHO cell incubated under the usual conditions (37 degrees C, CO25%).

[0019] When the culture medium containing example 1 transferrin 5mg/l., selenious-acid Na5microg/l, and polyvinyl alcohol 1 g/l was used, 10.8×10^5 -/ml was attained as maximum to survival cell density as maximum to 8.1×10^5 -/ml (after 189-hour culture time amount), and synthesis cell density (after 197-hour culture time amount).

[0020] When the culture medium containing example 2 124mg [/l.] iron acetate and polyvinyl alcohol 1 g/l was used, 25.7×10^5 -/ml was attained as maximum to survival cell density as maximum to 15.3×10^5 -/mg (after 164-hour culture time amount), and synthesis cell density (after the culture time amount of 164 hours after).

[0021] When the culture medium containing example triacetic acid iron 124 mg/l and methyl cellulose 0.5 g/l was used, 26.0×10^5 -/ml was attained as maximum to survival cell density as maximum to 14.4×10^5 -/mg (after 185-hour culture time amount), and synthesis cell density (after the culture time amount of 193 hours after).

[0022] The value acquired to the survival cell density or the comprehensive cell density of Examples 1-3 was illustrated to drawing 1 and 2.

[Translation done.]

*** NOTICES ***

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DESCRIPTION OF DRAWINGS

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1] The graph which shows the survival cell density depending on the culture time amount at the time of using a different culture medium.

[Drawing 2] The graph which shows the comprehensive cell density depending on culture time amount.

[Translation done.]

* NOTICES *

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.

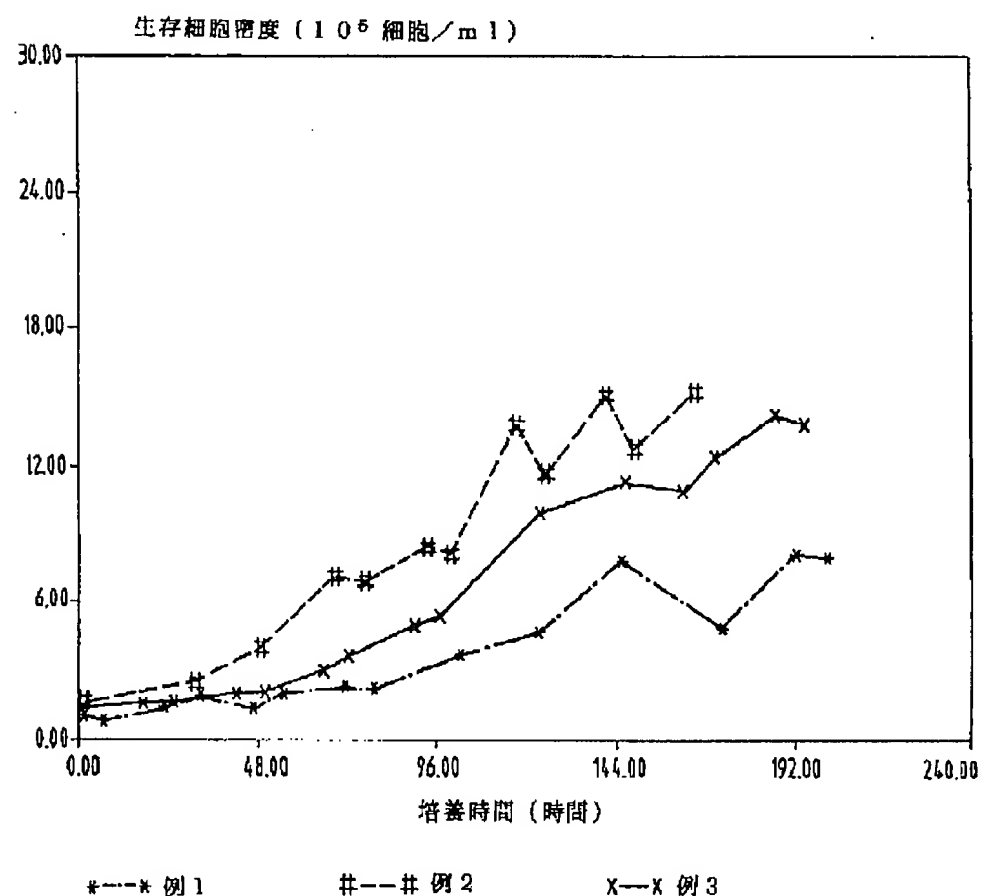
2.*** shows the word which can not be translated.

3.In the drawings, any words are not translated.

DRAWINGS

[Drawing 1]

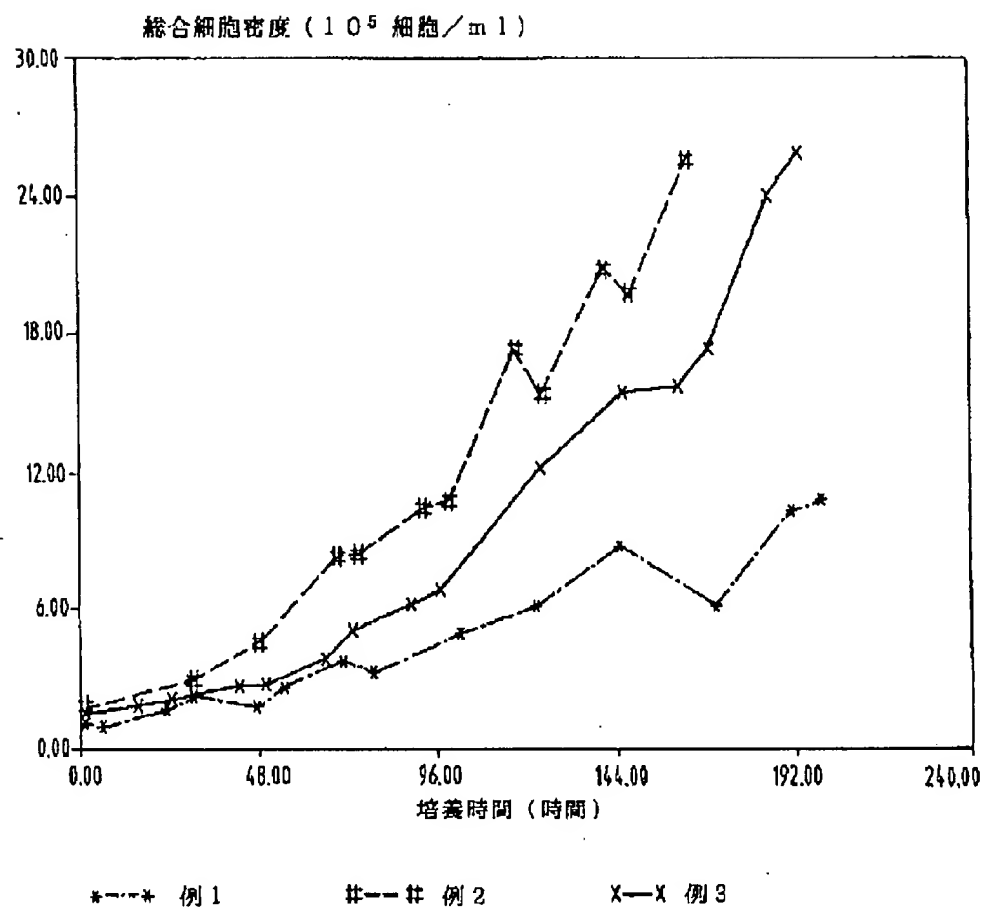
10 1-発癌槽中でのCHO細胞の血清不食の培養
生存細胞密度



[Drawing 2]

10 1-発酵槽中でのCHO細胞の血清不含の培養

総合細胞密度



[Translation done.]

【書類名】 刊行物等提出書
【提出日】 平成19年 6月 5日
【あて先】 特許庁長官 殿
【事件の表示】
 【出願番号】 特願2000-581164
 【出願公開番号】 特開2002-529072
【提出者】
 【住所又は居所】 省略
 【氏名又は名称】 省略
【提出する刊行物等】 (1) 特開平5-252942号公報
【提出の理由】
【提出物件の目録】
 【物件名】 [刊行物] (1) 特開平5-252942号公報
 【物件名】 [参考文献] (1) Biotechnol. Appl. Biochem. 40, 89-94 (2004)

【物件名】

【刊行物】 (1) 特開平5-252942号公報

Doc Ref. FP1
Appl. No. 09/830,968

【添付書類】



(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-252942

(43)公報日 平成5年(1993)10月6日

(51)Int.Cl.	識別記号	庁内整理番号	F1	技術表示箇所
C12N 5/08				
5/10				
C12P 21/00		C 8214-4B		
B (C12P 21/00		7296-4B	C12N 5/00	B
			審査請求 有	請求項の数12(全 6 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平4-117275

(22)出願日 平成4年(1992)5月11日

(31)優先権主張番号 P 4 1 1 5 7 2 2, 2

(32)優先日 1991年5月14日

(33)優先権主張国 ドイツ(DE)

(71)出願人 390009450

ベーリンガー マンハイム ゲゼルシャフト
ト ミット ベシュレンクテル ハフツン
グ
BOEHRINGER MANNHEIM
GESELLSCHAFT MIT B
ESCHRANKTER HAFTUNG
ドイツ連邦共和国 マンハイム 31 ザン
トホーフエルストラーセ 116

(72)発明者 シュテファン コッホ

ドイツ連邦共和国 ベンツベルク ラーゴ
ナー シュトラッセ 18

(74)代理人 弁理士 矢野 敏雄 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 動物起源のタンパク質材料なしで哺乳類細胞を培養するための血清不含有の培地および哺乳類細胞を培養する方法

(57)【要約】

【目的】 血清を有する培地を使用した培養条件に著しく近いが、ウイルス汚染の危険を示さないような、動物起源のタンパク質を含有していない全く一般的な種類の哺乳類のための血清不含有の培養培地の提供。

【構成】 通常の内容物の他に、動物性インシュリンおよびトランスフェリンの代わりに、原核生物からの組み換えインシュリンおよび水溶性鉄化合物を含有する動物起源のタンパク質材料なしの哺乳類細胞の培養のための血清不含有の培地。

(2)

特開平5-252842

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 常用の内容物質の他に、動物性インシュリンおよびトランスフェリンの代わりに、原核生物からの組み換えインシュリンおよび水溶性鉄化合物を含有する、動物起源のタンパク質材料なしで哺乳類細胞を培養するための血清不含の培地。

【請求項2】 インシュリンを0.1~20mg/lの量で、水溶性鉄化合物を 10^{-3} ~ 10^{-1} mol/lの濃度で含有する請求項1記載の培地。

【請求項3】 水溶性鉄化合物として、クエン酸鉄、硫酸鉄、塩化鉄および/またはヘキサシアノ鉄酸カリウムを含有する請求項1または2記載の培地。

【請求項4】 付加的にpH指示薬を含有する請求項1から3までのいずれか1項記載の培地。

【請求項5】 水に溶かされた、3~700mg/lの濃度のアミノ酸、0.001~50mg/lのビタミン、0.3~10g/lの単糖類、0.1~10000mg/lの無機塩、0.001~0.1の微量元素、0.1~50mg/lのヌクレオシド、0.001~10mg/lの脂肪酸、0.01~1mg/lのピオチン、0.1~20μg/lのヒドロコルチゾン、0.1~20mg/lのインシュリン、0.1~10mg/lのビタミンB12、0.01~1mg/lのブトレッシン、10~500mg/lのビルビン酸ナトリウム、水溶性鉄化合物、ならびに場合によりpH指示薬および抗生物質からなる請求項1から4までのいずれか1項記載の培地。

【請求項6】 付加的にポリビニルアルコールおよび/またはメチルセルロースを含有する請求項1から5までのいずれか1項記載の培地。

【請求項7】 CHO細胞の培養のために適している請求項1から6までのいずれか1項記載の培地。

【請求項8】 表現すべき外来遺伝子がエリトロポエチンに対する遺伝子である請求項7記載の培地。

【請求項9】 請求項1から8までのいずれか1項記載の培地中で培養することを特徴とする哺乳類細胞を培養する方法。

【請求項10】 欠乏させた培地を使用し、培養の間に2回、有利に48時間および96時間後に、それぞれ、組み換えインシュリン0.1~1g/l、グルコース40~200g/lおよびアスパラギン酸、アスパラギン×H₂O、ヒスチジン、メチオニン、プロリン、セリンそれぞれ0.4~3g/l、システイン×HCl×H₂O 0.1~5g/l、グルタミン1~8g/lおよびトリプトファン0.2~2g/lを添加し、それにより、請求項1から8までのいずれか1項記載の培地の相応する濃度が達成されている請求項9記載の方法。

【請求項11】 エリトロポエチンを分泌するCHO細胞を培養する請求項9または10記載の方法。

【請求項12】 エリトロポエチンに対する遺伝子を含

2

有するCHO細胞を、請求項1から8までのいずれか1項記載の培地中で、または請求項9から11までのいずれか1項記載の方法により培養し、この培地からエリトロポエチンを単離することを特徴とするエリトロポエチンの遺伝子工学的製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、動物起源のタンパク質材料なしで哺乳類細胞を培養するための血清不含の培地、ならびにこの種の培地を用いて哺乳類細胞、特にCHO細胞を培養する方法および最後に相応して形質転換したCHO細胞を本発明による培地中で生長させるエリトロポエチンの遺伝子工学的製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】培地中で動物細胞の生長のために、培地添加物としては、一般に血清、たいていウシ胎児血清が前選条件である。この場合、一定の基本成分、たとえば無機塩、アミノ酸、単糖類、ビタミンなどを含有する基本培地に、一定量の血清の添加物を混合し、それにより細胞に、細胞培養中での生長のための最も有利な条件を提供する。

【0003】公知の血清不含の培地において、血清を代用物質に交換することはすでに試みられている。たとえば、ドイツ連邦共和国特許出願公開第3789453号明細書から、融合細胞および骨髓腫細胞の培養のための血清不含の培地は公知であり、これは、合成培養培地において他の公知の添加物の代わりに水溶性の鉄化合物を含有している。この明細書の発明の詳細な説明の欄には、この水溶性の鉄化合物が血清中に含まれるトランスフェリンに対する代用物質であることが記載されている。融合細胞および骨髓腫細胞の培養のためには、この特許出願公開明細書によってここに挙げられた培地は使用可能である。

【0004】しかし、血清中には哺乳類細胞の生長に影響を及ぼすことができる他の物質が含有されている。トランスフェリンの他に、ここでは特にインシュリンおよびアルブミンが挙げられる。従って、全く一般的に哺乳類細胞の培養のために、血清不含の培地を使用する場合、血清を添加した条件にできる限り近づくように注意すべきである。しかし、治療薬の製造のために代用物質は重要である。この場合、認可官庁が細胞培養生成物において、動物またはヒト起源の培地添加物としてのタンパク質に関して特に注意している、それというのも、この成分を介して、たとえば病原ウイルスもまた細胞培養培地および同様に最終生成物に到達してしまうからである。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】従って、本発明の課題は、血清を有する培地を使用した培養条件に著しく近いが、ウイルス汚染の危険を示さないような、動物起源の

(3)

特開平5-252942

3

タンパク質を含有していない全く一般的な種類の哺乳類のための血清不含の培養培地を提供することであった。

【0008】

【課題を解決するための手段】前記の課題は、通常の内容物の他に、動物性インシュリンおよびトランスフェリンの代わりに、原核生物からの組み換えインシュリンおよび水溶性鉄化合物を含有する、動物起源のタンパク質材料なしの哺乳類細胞の培養のための血清不含の培地により解決される。

【0007】本発明による培地においてインシュリンを維持することにより、培養条件は、公知の血清不含の培養培地の場合よりも、血清を使用した培養条件に明らかに類似する。その他に、本発明による培地に原核生物からの組み換えインシュリンを使用することにより、ウイルス汚染の危険が避けられる。

【0008】培養培地の通常の通常の内容物質は当業者に公知であり、たとえば Medien Dulbecco's modified Eagle Medium (Virology 8 (1959) 396) または Medium F12 (Ham's F12 Medium, Proc. Natl. Acad. Sci. US A 53 (1965) 228) に記載されている。これは、特にアミノ酸、ビタミンならびに他の成分、たとえばグルコース、ヒルビン酸ナトリウム、特定の脂肪酸および無機塩である。

【0009】本発明の有利な実施態様において、培地は、0.1~20mg/lの量のインシュリンおよび10⁻⁴~10⁻¹mol/lの濃度の水溶性鉄化合物を含有する。水溶性鉄化合物として、特に酢鉄(III)、硫酸鉄(III)、塩化鉄(III)および/またはヘキサシアノ鉄酸カリウム(III)が使用される。

【0010】培養の場合の簡素化のために、通常、培地に付加的にpH指示薬を添加するのが有利である。この種の化合物は当業者に公知である。たとえばここではフェノールレッドが挙げられる。

【0011】本発明による特に有利な血清不含の培地は、3~700mg/lの濃度のアミノ酸、0.001~50mg/lのビタミン、0.3~10g/lの単糖類、0.1~10000mg/lの無機塩、0.001~0.1mg/lの微量元素、0.1~50mg/lのヌクレオシド、0.001~10mg/lの脂肪酸、0.01~1mg/lのビオチン、0.1~20μg/lのヒフコロールチン、0.1~20mg/lのインシュリン、0.1~10mg/lのビタミンB12、0.01~1mg/lのブトレシン、10~500mg/lのヒルビン酸ナトリウム、水溶性鉄化合物、ならびに場合によりpH指示薬および抗生物質を含有し、その際、前記の化合物は水に溶けて存在する。この場合、濃度表示はそれぞれ唯一の成分に関してあり、前記の化合物の総和に関するのではない。たとえば本発明により、DMEM-およびF12-培地の混合物が使用することができる。前記したような組成のさらに他の市販の

4

培地も、基本培地として使用することができ、相応して組み換えインシュリンおよび水溶性鉄化合物の特別な成分で補充することができる。

【0012】本発明の範囲内では、さらに、培地が付加的にポリビニルアルコールおよび/またはメチルセルロースを含有するのが特に有利である。ポリビニルアルコールの使用は、たとえば欧州特許第0248656号明細書、同様に、B. D. Bavister in The Journal of Experimental Zoology 217 (1981), 45-51 および ShinLon i et al. in Appl. Microbiol. Biotechnol. 27 (1988), 533-537 に記載されている。さらに、本発明による培地にとってポリビニルアルコールおよび/またはメチルセルロースの添加が有利である。この場合、これらの化合物は0.1~20g/lの濃度で使用するのが有利である。

【0013】本発明による培地は、特にCHO細胞の培養のために適していることを特徴としている。外来遺伝子を含有しかつ表現するCHO細胞の培養の際に、本発明による培地の特に良好な適性を示した。本発明の範囲内で、CHO細胞において表現すべき外来遺伝子は有利にエリトロポエチンに対する遺伝子である。

【0014】従って、本発明のもう一つの対象は、本発明による培地中で哺乳類細胞、特にCHO細胞を培養する方法である。この場合、特定の物質を欠乏させた本発明による培養培地を使用し、次いで培養の間に2回、有利に48時間と88時間後に、それぞれ組み換えインシュリン0.1~1g/l、グルコース40~200g/lおよびアスパラギン酸、アスパラギン×H₂O、ヒスチジン、メチオニン、プロリン、セリンそれぞれ0.4~3g/l、システイン×HCl×H₂O1~5g/l、グルタミン1~8g/lおよびトリプトファン2g/lからなる混合物それぞれ2容量%を添加し、それにより、本発明による培地の相応する濃度を達成する方法が特に有利であると判明した。この有利な方法操作の場合、生長を長い時間にわたり比較的高い割合に保持することができ、培養培地を即座に使用した場合および相応する化合物を最初から消費する場合よりもより高い細胞量が得られることが示された。

【0015】さらに、本発明による方法は、CHO細胞、特にエリトロポエチンを分泌するCHO細胞の培養に適している。

【0016】従って、本発明のもう一つの対象は、エリトロポエチンに対する遺伝子を含有するCHO細胞を本発明による培地中で、もしくは本発明による方法により培養し、培養培地からエリトロポエチンを単離するエリトロポエチンの遺伝子工学的製造方法である。

【0017】

【実施例】次に、本発明を図面を用いて実施例につき詳説する。

【0018】実施例中で使用した培地の記載

50

(4)

特開平5-252942

5

下記した例の培地は、3~700mg/lの濃度のアミノ酸、0.001~50mg/lのビタミン、0.3~10g/lの単糖類、0.1~10000mg/lの無機塩、0.001~0.1mg/lの微量元素、0.1~50mg/lのヌクレオシド、0.01~10mg/lの脂肪酸、さらにビルビン酸Na(10~500mg/l)およびpH指示薬を含有する。この培地は同じ容量割合からなる培地DME MおよびF12(Dulbeccos Modified Eagles Medium およびNutrient Mixture Hams F-12)をベースとして製造された。特別の成分として

次のものを含有している:

ヒオチン	0.2036mg/l
ヒドロコチゾン	3.8 μg/l
インシュリン(組み換え)	5.0 mg/l
ブトレーション	0.1 mg/l
ビタミンB12	0.78 mg/l

例1の培地中でその他に含まれるもの:

トランスフェリン(ヒト)	5 mg/l
亜セレン酸ナトリウム	5 μg/l
ポリビニルアルコール	1 g/l

例2の培地中でその他に含まれるもの:

酢酸鉄	124 mg/l
ポリビニルアルコール	1 g/l

例3の培地中でその他に含まれるもの:

酢酸鉄	124 mg/l
メチルセルロース	0.5 g/l

全ての8つの実施例においてCHO細胞は通常の条件下(37℃, CO₂ 5%)でインキュベートした。

[0019] 例1

6

トランスフェリン5mg/l、亜セレン酸Na5μg/lおよびポリビニルアルコール1g/lを含有する培地を使用する場合、生存細胞密度に対する最大値として $8.1 \times 10^4 / \text{ml}$ (189時間の培養時間の後)および総合細胞密度に対する最大値として $10.8 \times 10^4 / \text{ml}$ (197時間の培養時間の後)が達成された。

[0020] 例2

酢酸鉄124mg/lおよびポリビニルアルコール1g/lを含有する培地を使用する場合、生存細胞密度に対する最大値として $15.3 \times 10^4 / \text{mg}$ (184時間の培養時間の後)および総合細胞密度に対する最大値として $25.7 \times 10^4 / \text{ml}$ (184時間後の培養時間の後)が達成された。

[0021] 例3

酢酸鉄124mg/lおよびメチルセルロース0.5g/lを含有する培地を使用する場合、生存細胞密度に対する最大値として $14.4 \times 10^4 / \text{mg}$ (185時間の培養時間の後)および総合細胞密度に対する最大値として $28.0 \times 10^4 / \text{ml}$ (193時間後の培養時間の後)が達成された。

[0022] 例1~3の生存細胞密度もしくは総合細胞密度に対して得られた値は、図1および2に図示した。

[図面の簡単な説明]

[図1] 異なる培地を使用した際の培養時間に依存する生存細胞密度を示すグラフ。

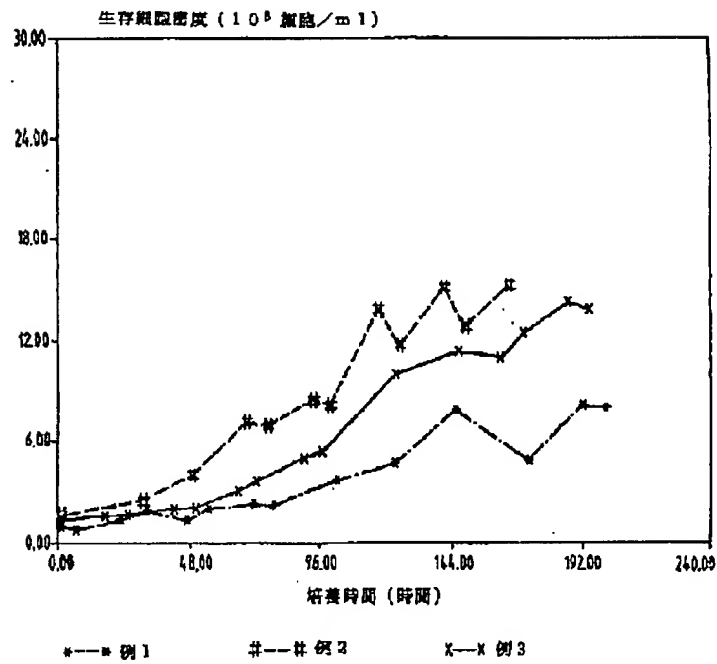
[図2] 培養時間に依存する総合細胞密度を示すグラフ。

(5)

特開平5-252942

【図1】

10-1-猪血清中のCHO細胞の血清不含有培養
生存細胞密度

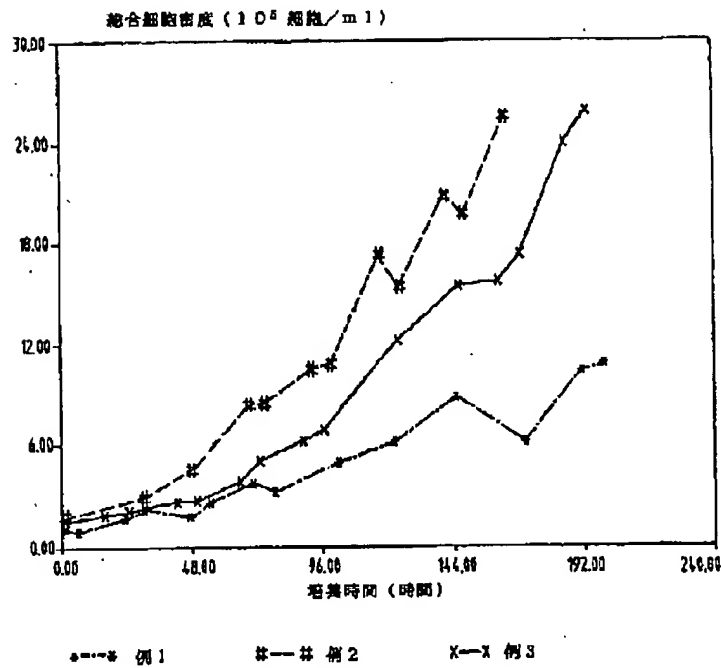


(5)

特開平5-252942

【図2】

10 1-死態様中でのCHO細胞の血清不含有培養
 細胞密度



フロントページの続き

(51)Int.Cl.
 C12R 1:91

識別記号

片内整理番号

FI

技術表示箇所

(72)発明者 ウルリッヒ ベーレント
 ドイツ連邦共和国 ビクル ハイムガルデ
 ンシュトラッセ 5
 (72)発明者 ラインハルト フランツェ
 ドイツ連邦共和国 ベンツベルク アム
 シュヴァーダーグラーベン 11

(72)発明者 トーマス ローレンツ
 ドイツ連邦共和国 ベンツベルク グルー
 ペ 10 アー
 (72)発明者 ベルトルト ツペラルスキー
 ドイツ連邦共和国 ベンツベルク ビルケ
 ンシュトラッセ 133

【物件名】 提出の理由

10701030090



【書類名】 刊行物等提出書
 【提出日】 平成19年6月5日
 【あて先】 特許庁長官 殿
 【事件の表示】
 【出願番号】 特願2000-581164
 【出願公開番号】 特表2002-529072
 【提出者】
 【住所又は居所】 省略
 【氏名又は名称】 省略



未 照 合

【提出する刊行物等】
 (1) 特開平5-252942号公報

【添付書類】

【提出の理由】
 (I) 提出理由の要約

6 90

イ. 特許法第29条第1項第3号

本願発明	刊行物
【請求項1】 A; ヒトエリスロポイエチンを得るための方法であって、 B; (a) インスリンを含む培養培地において相換えヒトエリスロポイエチンを発現する哺乳動物細胞を培養する工程、を包含する方法。	構成Aは、刊行物1の【0001】段落に記載されている。構成Bは、刊行物1の【0006】、【0016】段落に記載されている。
【請求項2】 C; 前記細胞がCHO、COS、BHK、Namalwa、およびHeLaを含む群から選択される、請求項1に記載の方法。	構成Cは、刊行物1の【0016】段落に記載されている。
【請求項3】 D; 前記細胞がCHO細胞を含む、請求項2に記載の方法。	構成Dは、刊行物1の【0016】段落に記載されている。
【請求項4】 E; 前記培養培地が培養培地1あたり1mgより多くのインスリンを含む、請求項1に記載の方法。	構成Eは、刊行物1の【0009】、【0011】段落に記載されている。
【請求項5】 F; 前記培養培地が培養培地1あたり20mgより少ないインスリンを含む、請求項1に記載の方法。	構成Fは、刊行物1の【0009】、【0011】段落に記載されている。
【請求項6】 G; 前記培養培地が無ウシ胎仔血清培地を含む、請求項1に記載の方法。	構成Gは、刊行物1の【0002】、【0006】段落に記載されている。

ロ. 特許法第29条第2項

本願発明	進歩性違反の理由
【請求項1】～【請求項6】	刊行物1と比較して、有利な効果を奏するものは認められない。
【請求項7】 A、B; 請求項1に記載の方法であって、 H; (b) 工程(a)からのEPOおよびインスリンを含む上清を細胞から分離する工程; I; (c) 工程(b)の上清を濃縮する工程;	刊行物1の【0016】段落に記載のEPOの遺伝子工学的製造方法を実施する上で、構成H～Jは当業者が当然にとりうる手段に過ぎない。

J ; および (d) 工程 (c) の濃縮産物を凍結する工程、をさらに包含する方法。	
[請求項 8] K ; 前記培地が工程 (b) の分離された細胞に添加され、そして該細胞が培養される、請求項 7 に記載の方法。	構成 K は、当業者が当然にとりうる手段に過ぎない。
[請求項 9] L ; 前記工程 (b) の上清が約 50 ~ 150 倍に濃縮される、請求項 7 に記載の方法。	構成 L は、設計事項に過ぎない。
[請求項 10] M ; 前記工程 (b) の上清が約 100 倍に濃縮される、請求項 7 に記載の方法。	構成 M は、設計事項に過ぎない。
[請求項 11] N ; 前記工程 (c) が約 3000 ダルトンの分子量カットオフを有する膜に通す接線濾過系を使用する工程を包含する、請求項 7 に記載の方法。	構成 N は周知である。また、カットオフ分子量を定めることは、設計事項に過ぎない。
[請求項 12] O ; (e) 直径約 0.2 mm の孔を有する膜を通して工程 (d) の濃縮産物を滅菌濾過する工程をさらに包含する、請求項 7 に記載の方法。	構成 O は当業者が当然にとりうる手段に過ぎない。また、膜の孔径を特定することは設計事項に過ぎない。

ハ. 特許法第 36 条第 6 項第 2 号

本願発明	不備の理由
[請求項 4] E ; 前記培養培地が培養培地 1 l あたり 1 mg より多くのインスリンを含む、請求項 1 に記載の方法。	下限のみを示す数値限定が用いられており、特許を受けようとする発明の外延が不明確である。
[請求項 9] L ; 前記工程 (b) の上清が約 50 ~ 150 倍に濃縮される、請求項 7 に記載の方法。	数値限定において、「約」なる語が用いられており、特許を受けようとする発明の範囲が不明確である。
[請求項 10] M ; 前記工程 (b) の上清が約 100 倍に濃縮される、請求項 7 に記載の方法。	数値限定において、「約」なる語が用いられており、特許を受けようとする発明の範囲が不明確である。
[請求項 11] N ; 前記工程 (c) が約 8000 ダルトンの分子量カットオフを有する膜に通す接線濾過系を使用する工程を包含する、請求項 7 に記載の方法。	数値限定において、「約」なる語が用いられており、特許を受けようとする発明の範囲が不明確である。
[請求項 12] O ; (e) 直径約 0.2 mm の孔を有する膜を通して工程 (d) の濃縮産物を滅菌濾過する工程をさらに包含する、請求項 7 に記載の方法。	数値限定において、「約」なる語が用いられており、特許を受けようとする発明の範囲が不明確である。また、0.2 mm の孔を有する膜では、通常、滅菌濾過はできないため、構成 O の技術的意義が不明である。

(I I) 手続きの経緯

出 願 平成11年11月8日
出願公開 平成14年9月10日
(特表2002-529072)
審査請求 平成18年11月02日

(I I I) 情報提供の根拠

〔特許法第29条第1項第3号〕

本願の下記の請求項に係る発明は、その出願前に公開された刊行物に記載されたものであるから、特許法第29条第1項第3号の規定により特許を受けることができない。

・請求項1～6 — 刊行物1

〔特許法第29条第2項〕

本願の下記の請求項に係る発明は、その出願前にその発明の属する技術の分野における通常の知識を有する者が容易に発明をすることができたものであるから、特許法第29条第2項の規定により特許を受けることができない。

・請求項1～12 — 刊行物1

〔特許法第36条第6項第2号〕

本願は、特許請求の範囲の記載が、特許法第36条第6項第2号に規定する要件を満たしていないため、特許を受けることができない。

(I V) 本願発明

請求項1～12に記載された発明は、特許請求の範囲の記載に基づいて、それぞれ下記の構成を有する。

〔請求項1〕

A；ヒトエリスロポイエチンを得るための方法であって、
B；(a) インスリンを含む培養培地において組換えヒトエリスロポイエチンを発現する哺乳動物細胞を培養する工程、を包含する方法。

〔請求項2〕

C；前記細胞がCHO、COS、BHK、Namalwa、およびHeLaを含む群から選択される、請求項1に記載の方法。

〔請求項3〕

D；前記細胞がCHO細胞を含む、請求項2に記載の方法。

〔請求項4〕

E；前記培養培地が培養培地1あたり1mgより多くのインスリンを含む、請求項1に記載の方法。

〔請求項5〕

F；前記培養培地が培養培地1あたり20mgより少ないインスリンを含む、請求項1に記載の方法。

〔請求項6〕

G；前記培養培地が無ウシ胎仔血清培地を含む、請求項1に記載の方法。

〔請求項7〕

A、B；請求項1に記載の方法であって、
H；(b) 工程(a)からのEPOおよびインスリンを含む上清を細胞から分離する工程；

I；(c) 工程(b)の上清を濃縮する工程；

J；および(d) 工程(c)の濃縮産物を凍結する工程、をさらに包含する方法。

【請求項8】

K; 前記培地が工程(b)の分離された細胞に添加され、そして該細胞が培養される、請求項7に記載の方法。

【請求項9】

L; 前記工程(b)の上清が約50~150倍に濃縮される、請求項7に記載の方法。

【請求項10】

M; 前記工程(b)の上清が約100倍に濃縮される、請求項7に記載の方法。

【請求項11】

N; 前記工程(c)が約3000ダルトンの分子量カットオフを有する膜に通す接線濾過系を使用する工程を包含する、請求項7に記載の方法。

【請求項12】

O; (e)直径約0.2mmの孔を有する膜を通して工程(d)の濃縮産物を滅菌濾過する工程をさらに包含する、請求項7に記載の方法。

(V) 本願発明と刊行物の記載事項との対比

1. 発明の技術分野

本願発明並びに刊行物1は何れも、インスリンを含有する培養培地を用いて組換えエリトロポイエチン(EPO)を産生する方法に関するものであることが、本願明細書の【0001】段落、刊行物1の【0001】段落に記載されている。従って、上記刊行物1は本願発明と同一の技術分野に属している。

2. 記載事項の対比

前掲の表に記載した本願発明の請求項1~12の記載と、刊行物1の記載との対応関係についてさらに詳細に説明する。

・請求項1(構成A+B)

刊行物1には、「原核生物からの組み換えインシュリンを含有する、動物起源のタンパク質材料なしの哺乳類細胞の培養のための血清不含の培地」(刊行物1の【0006】段落等を参照)が記載されている。また、刊行物1には、上記培地を用いて、エリトロポイエチン(以下、「EPO」という)に対する遺伝子を含有するCHO細胞を培養し、培養培地からEPOを単離するEPOの遺伝子工学的製造方法(刊行物1の【0016】段落等を参照)が記載されている。なお、EPOに対する遺伝子は、外来遺伝子であることが記載されており(刊行物1の請求項8等を参照)、上記EPOは組換えEPOであることが意図されている。つまり、刊行物1は、本願請求項1の構成A+Bを開示するものであることは明らかである。

よって、本願請求項1に係る発明は、特許法第29条第1項第3号の規定により、特許を受けることができないことは明白である。

また、仮に、本願請求項1に対して、本願当初明細書の範囲内で、刊行物1に開示されていない構成に変更する補正を行ったとしても、本願当初明細書には、刊行物1からは予測しえない有利な効果は記載されていない。本願当初明細書の【0009】段落には、本願発明の効果として、「培地へのインスリンの添加により、低濃度の夾雑タンパク質を含む予期しない大量のEPOが産生され、これにより、後のEPO精製工程を高め、そして高いタンパク質回収率を生じる」旨が記載されているが、その程度は、刊行物1と比較して、顕著に優れるものとはいえない。

よって、本願請求項1に係る発明は、本願当初明細書の範囲内で、刊行物1に開示されていない構成に変更する補正を行ったとしても、特許法第29条第2項の規定により、特許を受けることができないことは明白である。

・請求項2および3(構成CおよびD)

上述したように、刊行物1の【0016】には、EPOに対する遺伝子を含有するCH

O細胞の培養培地からEPOを単離することが記載されている。つまり、刊行物1は、本願請求項2の構成C、並びに本願請求項3の構成Dを開示していることは明らかである。

よって、本願請求項2および3に係る発明は、特許法第29条第1項第3号の規定により、特許を受けることができないことは明白である。

また、本願当初明細書には、刊行物1からは予測しえない有利な効果は記載されていない。そのため、本願請求項2および3に対して、本願当初明細書の範囲内で、刊行物1に開示されていない構成に変更する補正を行ったとしても、特許法第29条第2項の規定により、特許を受けることができないことは明白である。

・請求項4および5（構成EおよびF）

刊行物1には、0.1～20mg/lの量のインスリンを培地に添加することが記載されている（刊行物1の〔0009〕、〔0011〕段落等を参照）。また、実施例では、5mgのインスリンが添加されている（刊行物1の〔0018〕段落を参照）。従って、刊行物1は、構成EおよびFを開示していることは明らかである。

よって、本願請求項4および5に係る発明は、特許法第29条第1項第3号の規定により、特許を受けることができないことは明白である。

また、本願当初明細書には、刊行物1からは予測しえない有利な効果は記載されていない。そのため、本願請求項4および5に対して、本願当初明細書の範囲内で、刊行物1に開示されていない構成に変更する補正を行ったとしても、特許法第29条第2項の規定により、特許を受けることができないことは明白である。

・請求項6（構成G）

上述したように、刊行物1には、血清不含の培地が記載されている。刊行物1では、血清としてウシ胎児血清が意図されている（刊行物1の〔0002〕段落等を参照）。つまり、刊行物1の培地は、ウシ胎児血清を含まない培地である。従って、刊行物1が構成Gを開示していることは明らかである。

よって、本願請求項6に係る発明は、特許法第29条第1項第3号の規定により、特許を受けることができないことは明白である。

また、本願当初明細書には、刊行物1からは予測しえない有利な効果は記載されていない。そのため、本願請求項6に対して、本願当初明細書の範囲内で、刊行物1に開示されていない構成に変更する補正を行ったとしても、特許法第29条第2項の規定により、特許を受けることができないことは明白である。

・請求項7～11（構成H～N）

刊行物1には、本文記載の培地は、EPOを分泌するCHO細胞の培養に適していることが記載されている（刊行物1の〔0015〕段落等を参照）。また、EPOに対する遺伝子を含有するCHO細胞を、上記培地中で培養し、培養培地からEPOを単離することが記載されている（刊行物1の〔0016〕段落等を参照）。また、EPOに対する遺伝子が、外来遺伝子であることが記載されている（刊行物1の請求項8等を参照）。つまり、刊行物1は、組換えEPOを分泌するCHO細胞を、インスリンを含む培地で培養し、インスリンと組換えEPOを含む培地から、組換えEPOを単離する方法を開示していることは明らかである。

ここで、該方法を実施にするにあたり、EPOおよびインスリンを含む上清を細胞から分離したり（構成H）、該上清を濃縮したり（構成I）、該濃縮物を凍結したり（構成J）することは、当業者が通常行う操作に過ぎない。例えば、上記構成Iについていえば、一般的に、タンパク質精製の際に用いるクロマトグラフィーに供する前に、バッファー交換をしたり、クロマトグラフィーへの負荷量を小さくしたりするために、濃縮操作を行うことは、当業者が通常行う操作に過ぎない（必要であれば、参考文献1を参照）。なお、参考文献1は、本願優先日後に発行されたものであるが、本願優先日当時の技術水準を示す文献である。

さらに、上記構成Jについていえば、上記構成Iの実行後、連続して精製工程に供しない場合や、一定量まで蓄積した後、精製工程に供する場合に、上記濃縮物を一時的に保存するために、当業者が通常行う操作に過ぎない。

また、上記上清と分離された細胞に、再度培地を添加し、該細胞を培養する（構成K）ことは、当然にとりうる手段に過ぎない。

さらに、上記上清を濃縮するにあたり、どの程度濃縮するか（構成L、M）や、どのような濃縮手段を採用するか（構成N）は、当業者が適宜設定するものであり、構成L～Nは設計事項に過ぎない。例えば、

また、本願発明は、構成H～Nを備えることにより、当業者が予測しえないほどの有利な効果を奏しているともいえない。

よって、本願請求項7～11に係る発明は、特許法第29条第2項の規定により、特許を受けることができないことは明白である。

・請求項12（構成O）

タンパク質を必要に応じて、濾過滅菌することは周知である。また、濾過滅菌に用いる膜の孔径を定めることは、設計事項に過ぎない。よって、本願請求項12に係る発明は、特許法第29条第2項の規定により、特許を受けることができないことは明白である。

（V I）記載不備

・請求項4

本願請求項4では、インスリンの添加量の下限のみを示す数値限定が用いられており、特許を受けようとする発明の外延が不明確である。

よって、本願請求項4に係る発明は、特許法第36条第6項第2号の規定により、特許を受けることができないことは明白である。

・請求項9～11

本願請求項9～11では、数値限定において、「約」なる語が用いられており、特許を受けようとする発明の範囲が不明確である。

よって、本願請求項9～11に係る発明は、特許法第36条第6項第2号の規定により、特許を受けることができないことは明白である。

・請求項12

本願請求項12には、約0.2mmの孔を有する膜を用いて滅菌濾過する（構成O）ことが記載されているが、通常、このような孔径の膜では、濾過滅菌することはできない。従って、構成Oの技術的意義が不明である。

さらに、数値限定において、「約」なる語が用いられており、特許を受けようとする発明の範囲が不明確である。

よって、本願請求項12に係る発明は、特許法第36条第6項第2号の規定により、特許を受けることができないことは明白である。

（V I I）結び

以上、詳述したように、本願請求項1～6に係る発明は、何れも刊行物1に実質的に記載された発明であるから、当該発明は、特許法第29条第1項第3号の規定により特許を受けることができないものである。

さらに、本願請求項7～12は、刊行物1に記載された発明に基づいて当業者が極めて容易になし得たものであるから、特許法第29条第2項の規定により特許を受けることができないものである。

加えて、本願は、特許請求の範囲の記載が、特許法第36条第6項第2号に規定する要件を満たしていないため、特許を受けることができないものである。

【物件名】

【参考文献】 (1) Biotechnol. Appl. Biochem. 40. 89-94 (2004)

Biotechnol. Appl. Biochem. (2004) 40, 89-94 (Printed in Great Britain)

【添付書類】



An improved, inexpensive procedure for the large-scale purification of recombinant human erythropoietin

Yunlong Hu^a, Song Chen^a, Mei Xu^a and Shuangquan Zhang^a

^aAcademy of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210094, People's Republic of China, and
†Nanjing Huaxin Biopharmaceutical Co., 293-2 Zhongshan East Road, Nanjing 210002, People's Republic of China

A rapid and simple chromatographic procedure has been developed for the large-scale purification of therapeutic-grade rHuEPO (recombinant human erythropoietin) from medium-conditioned cell cultures, which includes ion-exchange, hydrophobic-interaction and gel-filtration chromatography. A combination of these well-connected steps results in highly purified rHuEPO (> 99%), as revealed by SDS/PAGE and HPLC analyses, with a total yield of 38%. The specific activity of purified rHuEPO was 160 104 Lu/mg. Immunoblotting studies revealed that the protein possesses native EPO immunity. N-terminal sequencing of rHuEPO shows that the first 15 amino acids coincide with those of native EPO reported previously.

Introduction

Erythropoietin (EPO) is a glycoprotein primarily produced by human kidney with an apparent molecular mass of 34–38 kDa and a carbohydrate content of 40%, which is pivotal to its *in vivo* biological activity [1,2]. rHuEPO (recombinant human EPO), expressed by CHO (Chinese-hamster ovary) cells, displays physicochemical properties very similar to those of native EPO [2]. Since rHuEPO was first produced in CHO cells [3], it has been the most successful recombinant therapeutic protein on the market. The potential market for this glycoprotein is increasing, owing to frequent discoveries of novel applications of EPO [4,5] and also on account of the introduction of a policy of patent expiry dates. It is therefore necessary to develop a large-scale preparative method for rHuEPO that combines high quality with low cost.

After the initial successful purification of EPO from urines of patients with aplastic anaemia by the seven-step procedures developed by Miyake *et al.* [6], several schemes have since been reported for rHuEPO purification from different mammalian expression systems [10–12]. Although resulting in good specific activity and yields, they are only suitable for laboratory-scale preparations. They cannot be easily modified to suit biopharmaceutical industry-level purification for a number of reasons. For instance, Wojchowski *et al.* [11] purified rHuEPO using a rabbit anti-EPO peptide

antibody column, but there were several problems, such as the leakage of monoclonal antibody, cleanliness and sanitary conditions prevailing and process validation. Broudy *et al.* [10] purified rHuEPO using RP (reverse-phase) chromatography and organic solvents, which tend to cause denaturation of protein during the process of purification. In the present study, we propose a new, improved preparative method for large-scale purification of rHuEPO from CHO cells for therapeutic use using hydrophobic-interaction chromatography combined with DEAE ion-exchange chromatography and gel-filtration chromatography.

Materials and methods

Tris, urea, glycine and ammonium sulphate were purchased from Gibco BRL (Gaithersburg, MD, U.S.A.). All other chemical reagents were of the highest purity commercially available. All chromatographic procedures were performed on BiSPilot system (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) at 15–20 °C. All the buffers prepared using water for injection were filtered using a 0.2 µm membrane (Millipore, Bedford, MA, U.S.A.) before use.

CHO cells stably transfected with human EPO cDNA were cultured using DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium; Gibco BRL) containing 5% (v/v) fetal-bovine serum (Hyclone, Logan, UT, U.S.A.) in roller bottles [13]. rHuEPO was prepared using DMEM/F12 medium (Gibco BRL). After cultivation for 7 days, the supernatant was harvested by continuous-flow centrifugation at 5000 g and 4 °C to remove the cell debris.

Large-scale purification of rHuEPO

Concentration and desalting The centrifuged supernatant (100 litres) was concentrated and desalted using a Pellicon system (Millipore) with a 10 kDa cut-off membrane, until the conductivity of the filtrate liquid was almost equal to

Key words: chromatography, large-scale preparation, recombinant human erythropoietin (rHuEPO).

Abbreviations used: CHO cell, Chinese-hamster ovary cell; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; EPO, erythropoietin; rHuEPO, recombinant human EPO; RP, reverse phase.

To whom correspondence should be addressed (email ylh@online.com).

2

98

Y. Hu and others

that of the desalting buffer (10 mM Tris/HCl, pH 7.0). The final volume was approx. 5 litres.

DEAE ion-exchange chromatography The concentrated dialysed liquid was collected, centrifuged at 6000 g for 5 min (4°C) to remove the precipitated protein and loaded on to a DEAE-Sepharose FF XK50 column (5 cm × 15 cm; Amersham Biosciences), which was equilibrated with buffer A (10 mM Tris/HCl, pH 7.0). After loading, the column was initially washed with 3 column vol. of buffer B (1 mM glycine/6 M urea, pH 4.55), followed by washing with 5 column vol. of buffer C (10 mM Tris/HCl buffer (pH 7.0), containing 25 mM NaCl). EPO proteins were eluted with buffer D (10 mM Tris/HCl buffer (pH 7.0), containing 100 mM NaCl) at a flow rate of 25 ml/min. The elution profile was monitored by UV absorbance at 280 nm. The required fraction (0.49 litre) was collected and analysed for protein concentration by the Lowry method [14], for EPO activity by ELISA and for molecular mass by SDS/PAGE.

Hydrophobic-interaction chromatography The collected fraction (0.49 litre), saturated with 1.2 M ammonium sulphate solution, was applied on to a butyl-Sepharose FF XK26 column (2.6 cm × 25 cm; Amersham Biosciences) equilibrated with 1.2 M ammonium sulphate solution (pH 6.3). After loading, the column was washed with 2 column vol. of 1.2 M ammonium sulphate solution (pH 6.3) at a flow rate of 12 ml/min. The EPO protein peak was then eluted with buffer A and analysed for EPO activity by ELISA, for molecular mass by SDS/PAGE and for protein concentration by the Lowry method [14].

Gel-filtration chromatography The fraction collected after the butyl-Sepharose chromatography was applied on to a Sephacryl S-200HR XK50 column (5 cm × 100 cm; Amersham Biosciences) equilibrated with citrate buffer (20 mM sodium citrate/100 mM sodium chloride, pH 7.0) at a flow rate of 10 ml/min. The EPO protein peak was eluted with the same buffer. The EPO fractions were collected and filtrated using a 0.2 µm-pore-size Capvacum 60 filter (Pall Corporation, Ann Arbor, MI, U.S.A.). The final solution was stored at 2–8°C. The purified sample was subjected to capillary zone electrophoresis, N-terminal sequence analysis, SDS/PAGE, HPLC, Western-blot analysis, etc.

Determination of protein concentration The protein concentration was determined by the Lowry method [14], using BSA as the standard.

N-terminal amino acid analysis Purified EPO was subjected to N-terminal amino acid sequencing using the Edman degradation method at the Department of Biotechnology, Beijing University (Beijing, People's Republic of China).

Assay of biological activity The *in vitro* specific activity of rHuEPO was measured by ELISA (commercially available as Quantikine IVD; R&D Systems, Minneapolis, MN, U.S.A.). The *in vivo* specific activity was measured by the reticulocyte method described previously [15].

Assay of molecular mass and purity We assessed the purity and molecular mass of the purified sample by SDS/PAGE by the method of Laemmli [16], using 12.5% (w/v) polyacrylamide gels in the presence of 0.1% SDS under both reducing and non-reducing conditions. Electrophoresis was performed using Pharmacia LKB Multiphor II Electrophoresis System. Low-molecular-mass protein standards were obtained from Amersham Biosciences (phosphorylase δ , 94 kDa; BSA, 67 kDa; ovalbumin, 43 kDa; carbonic anhydrase, 30 kDa; trypsin inhibitor, 20.1 kDa; α -lactalbumin, 14 kDa). After electrophoresis, the gel was silver-stained for protein. Purity of the purified rHuEPO was measured by densitometric scanning of silver-stained SDS/PAGE slab using FR-205 Electrophoresis Image Analysis System and Smart View 2001 Analysis program (Shanghai Fuli Biotech, Shanghai, People's Republic of China).

Purified samples were also analysed on the HPLC system (Agilent 1100 series) and loaded on to an HPLC TSK-GEL G3000SWXL column (5 µm, 7.8 mm × 300 mm) equilibrated with a buffer prepared using 1.5 mM potassium dihydrogen phosphate, 8.1 mM disodium hydrogen phosphate and 0.4 M sodium chloride (pH 7.4). The flow rate was 0.5 ml/min, the eluent was monitored by spectrophotometry at 214 nm, and fluorescence was detected using an excitation wavelength of 280 nm and an emission wavelength of 340 nm.

Western-blot analysis We performed Western-blot analysis by the method of Balwit [11]. Monoclonal mouse anti-human EPO (IgG₁k) was obtained from R&D Systems. The second antibody was horseradish-peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG obtained from China Jingmei BioTech Co. (Shenzhen, People's Republic of China).

Capillary zone electrophoresis Electrophoresis was performed using a Beckman PACE MDQ CE 5000 instrument and detected spectrophotometrically at 214 nm by the method described in [16a].

Results and discussion

EPO is a hydrophobic acidic glycoprotein. The carbohydrate content is approx. 40% [2]. The degree and type of glycosylation of EPO is the key factor for *in vivo* biological activity [18]. If rHuEPO is partially deglycosylated during

separation, it is more susceptible to bind the galactoside receptor on hepatic cells. Thus the half-life of EPO in the blood circulation of the human body is very much shortened, which induces a significant or complete decrease in *in vivo* bioactivity [19]. Therefore it is important to protect the integrity of the sugar chain of rHuEPO during the purification process.

Based on the fact that the pI value of EPO is in the range 2.8-4.55 [20], we selected DEAE-Sepharose FF ion-exchange chromatography and used buffer B for washing the column to remove most impurities (Figure 1). A 6 M concentration of urea may inhibit the activation of acid processes under the condition of low pH [21] and prevent degradation of the sugar chain of rHuEPO during the purification process. Cyanate ions are easily formed during long-term storage of urea solution. They might cause carbamylation of lysine residues in the EPO protein, resulting in partial loss of bioactivity of rHuEPO [22]; hence, using a fresh urea solution may prevent the risk of protein modification. Glycine (1 mM) was added to the urea solution to neutralize the cyanate ions, since cyanate ions react more quickly with glycine residues than with lysine residues [23]. The EPO eluent fraction was subjected to hydrophobic-interaction chromatography on the butyl-Sepharose FF column to remove relatively weak hydrophobic proteins and nucleic acids (Figure 2). Finally, chromatography on a Sephacryl S-200HR molecular-sieve column was performed to remove the EPO polymer (Figure 3).

Several attempts to purify natural EPO and rHuEPO have been reported previously [6-12]. Most of these studies involved RP chromatography and affinity chromatography. In general, RP-HPLC uses organic solvents, causing the denaturation of the protein. In the present study, we propose a facile route for the purification of rHuEPO that does not employ RP-HPLC and therefore avoids the use of organic solvents. Despite the fact that affinity-chromatography methods have the purification power to decrease the number of steps and increase the yield, they have some shortcomings, particularly with regard to regulatory issues such as process validation. From an industrial point of view, the immunoaffinity media, in general, cannot resist strong conditions such as cleaning and sanitation procedures, particularly when using sodium hydroxide of high concentration. Owing to the leakage of monoclonal antibody during the purification, it is difficult to validate the downstream purification process.

SDS/PAGE of the eluates from each chromatography column showed increasing purity of the purified rHuEPO. Both reducing and non-reducing SDS/PAGE of the purified rHuEPO showed a single protein zone with an apparent molecular mass of 36-42 kDa. Densitometric scanning of the silver-stained gel demonstrated that the purity of final purified rHuEPO was >99% (Figure 4).

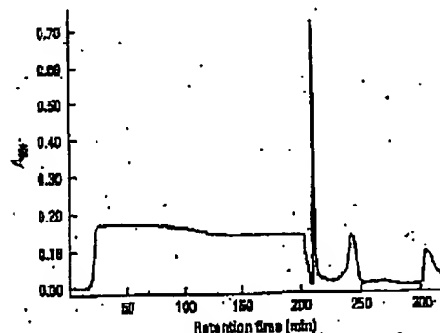


Figure 1 Elution of rHuEPO by ion-exchange chromatography

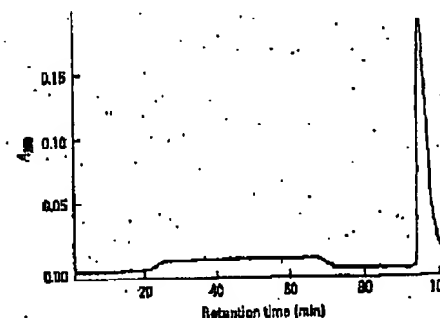


Figure 2 Elution of rHuEPO by hydrophobic interaction chromatography

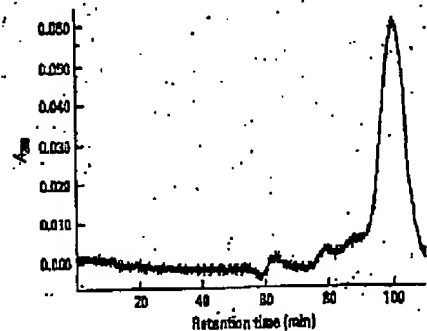


Figure 3 Elution of rHuEPO by gel-filtration chromatography

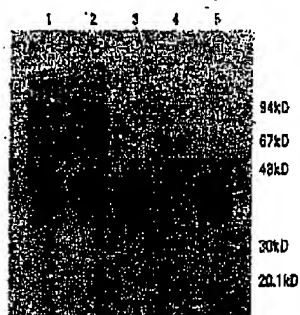


Figure 4 SDS/PAGE of fractions from each chromatography

Lane 1, DEAE-Sepharose FF eluate; lane 2, butyl-Sepharose FF eluate; lane 3, Sephacryl S-200HR eluate (non-reduced); lane 4, protein molecular-mass standards; lane 5, Sephacryl S-200HR eluate (reduced). kD = kDa.

Western-blot analyses showed that purified rHuEPO has native immunogenicity (Figure 6). After HPLC TSK-GEL G3000SWXL column analysis, only one peak with > 99% purity was detected (Figure 5). Owing to extensive glycosylation, EPO is a highly heterogeneous protein, i.e. a complex mixture of different, but closely related, glycoforms [24,25]. Capillary electrophoresis results revealed that the percentage of each isoform of rHuEPO complies with



Figure 6 Western-blot analysis of rHuEPO

Lane 1, reduced purified rHuEPO sample; lane 2, non-reduced purified rHuEPO sample.

the criteria of European Pharmacopoeia (Figure 7). Moreover, the first 15 amino acids of the recombinant protein coincide with those of native EPO reported previously. The overall recovery of rHuEPO activity was 38%, and the specific activity was 160 104 i.u./mg (Table 1).

Furthermore, to verify whether purified rHuEPO meets the requirements for therapeutic use, according to European Pharmacopoeia, we measured the endotoxin and DNA content in the purified rHuEPO and they were 2 i.u. and 100 pg respectively in a volume containing 10 000 i.u. of EPO. Both results met the criteria. In conclusion, we have developed a simple, inexpensive, high-yield method suitable

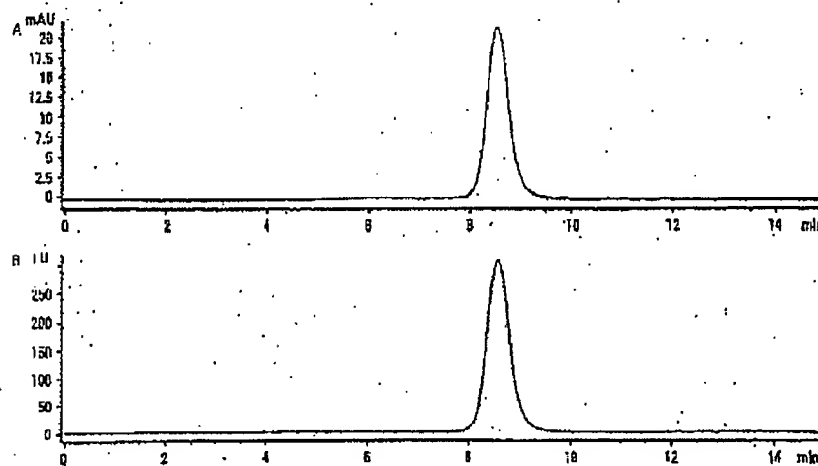


Figure 5 Gel filtration of purified rHuEPO on an HPLC TSK-GEL G3000SWXL column

(A) HPLC elution profile of purified rHuEPO (detected by spectrophotometry at 214 nm); (B) HPLC elution profile of purified rHuEPO (fluorescence at 340 nm after excitation at 280 nm).

Purification procedure for recombinant human erythropoietin

91

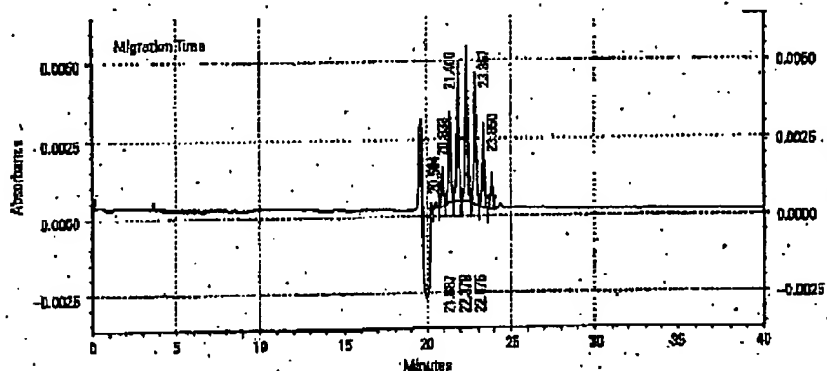


Figure 7 Capillary zone electrophoresis analysis of purified rHuEPO

Table 1 Summary of purification of rHuEPO

Step	Volume (litres)	[Protein] (mg/ml)	Bioactivity (units/ml)	Sp. activity (units/mg)	Recovery (%)
Centrifuged supernatant	100		2243		100
Ultrafiltration and concentration	8.0	4.59	39 813	8673	88.75
DEAE-Sephacrose FF	0.49	1.95	207 190	118 294	51.0
Buyl-Sephacrose FF	0.14	4.84	652 648	134 843	90.0
Sephacryl S-200HR	0.16	1.16	185 721	160 104	93.5

for large-scale purification and it was not susceptible to contamination during the purification process.

References

1. Lai, P. H., Everett, R., Wang, F. F., Arakawa, T. and Goldwasser, E. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 3116-3121.
2. Davis, J. M., Arakawa, T., Strick, T. W. and Yphantis, D. A. (1987) *Biochemistry* 26, 2633-2638.
3. Lin, E. K., Suggs, S., Lin, C. H., Browne, J. K., Smalling, R., Egrie, J. C., Chen, K. K., Fox, G. M., Martin, F., Stabinisky, Z. et al. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 7580-7584.
4. Henry, D. H. and Spivak, J. L. (1995) *Curr. Opin. Hematol.* 2, 118-124.
5. Buzsáki, M., Cavallaro, E., Roccaro, F., Sturiale, A., Alzisi, C., Trimarchi, M., Corica, F. and Frisina, N. J. (2003) *Neural. Pathol. Exp. Neurol.* 62, 228-236.
6. Miyake, T., Kung, C. K. H. and Goldwasser, E. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 5558-5564.
7. Matsushita, J., Kawabata, M., Shibuya, K., Koishihara, Y., Sakaiguchi, M. and Taketaki, A. (1990) *Acta Haematol.* 84, 169-174.
8. Huang, S. L. (1980) *Blood* 56, 620-624.
9. Krystal, G., Pankratz, H. R., Farber, N. M. and Smart, J. E. (1986) *Blood* 67, 71-79.
10. Broudy, V. C., Tait, J. R. and Powell, J. S. (1988) *Arch. Biochem. Biophys.* 265, 329-336.
11. Wojchowski, D. M., Sun, J. M. and Sytkowski, A. J. (1987) *Biochim. Biophys. Acta* 913, 170-178.
12. Ben, Ghajem, A., Winchenne, J. J., Lopez, C., Chretien, S., Duberry, M., Crescu, C. T., Le Caer, J. P., Casadevall, N., Rouger, P. and Cartron, J. P. (1994) *Prep. Biochem.* 24, 127-142.
13. Hu, Y. L., Fang, J., Shi, J., Wu, G., Nie, H. Y., Dia, Y., Wang, X. C. and Tao, K. H. (1999) *J. Chin. Biochem. Pharmacol.* 20, 275-278.
14. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
15. Hayakawa, T., Wada, M., Mizuno, K., Abe, S., Miyashita, M. and Ueda, M. (1992) *Biologicals* 20, 243-251.
16. Lammli, U. K. (1970) *Nature (London)* 227, 680-685.
- 16a. European Directorate for the Quality of Medicines - Council of Europe (2002). *European Pharmacopoeia*, 4th edn, Council of Europe, Strasbourg.
17. Balwit, J. M. (ed.) (1995) *Neural Notes* 1, 3-5.

61

- 18 Takeuchi, M., Inoue, N., Strickland, T. W., Kubota, M., Wada, M., Shimizu, R., Hoshi, S., Kozutsu, H., Takasugi, S. and Kobata, A. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 7819-7822.
- 19 Tsuda, E., Kawanishi, G., Ueda, M., Matsuda, S. and Sasaki, R. (1990) *Eur. J. Biochem.* **188**, 405-411.
- 20 Endo, Y., Nagai, H., Watanabe, Y., Ochi, K. and Takagi, T. (1992) *J. Biochem. (Tokyo)* **112**, 700-705.
- 21 Saijo-Hamano, Y., Namba, K. and Oosawa, K. (2000) *J. Struct. Biol.* **132**, 142-146.
- 22 Sotakis, R., Kozutsu, H., Takeuchi, M. and Asano, K. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* **1038**, 125-129.
- 23 Stark, G. (1965) *Biochemistry* **4**, 1030-1036.
- 24 Némethy, M., Marín, W., Wray, V., Kloppel, K. D., Augustin, J. and Connat, H. S. (1993) *Eur. J. Biochem.* **213**, 39-56.
- 25 Rush, R. S., Derby, P. L., Smith, D. M., Merry, C., Rogers, G., Rohda, M. F. and Katta, V. (1995) *Anal. Chem.* **67**, 1442-1452.

Received 27 October 2003; accepted 5 December 2003
Published as Immediate Publication 5 December 2003.
DOI: 10.1042/BA20030189